

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation</b> <sup>7</sup> : <b>C12N 15/10</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 00/29562</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> <b>25. Mai 2000 (25.05.00)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> <b>PCT/EP99/08091</b>		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 26. Oktober 1999 (26.10.99)			
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 51 156.6 6. November 1998 (06.11.98) DE		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Postfach, D-64271 Darmstadt (DE).			
<b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> HOLSCHUH, Karl [DE/DE]; Weinbergstrasse 16, D-64342 Seeheim-Jugenheim (DE). MICELSEN, Uwe [DE/DE]; Am Drachenstein 17, D-69469 Weinheim (DE).			

**(54) Title:** METHOD OF ISOLATING PLASMID DNA**(54) Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA**(57) Abstract**

The invention relates to a method of isolating plasmid DNA from cultures of microorganisms using solid phase bodies. The method is characterized by the following steps: a) adjusting the culture of microorganisms to an acidic pH, mixing it with the solid phase bodies, incubating and separation, b) resuspending the microorganisms immobilized on the solid phase bodies, lysing them, mixing them with a neutralizing binding buffer, incubating the mixture, separating and discarding the solid phase bodies, c) again mixing the supernatant with solid phase bodies, incubating the mixture, separating it and eluting the plasmid DNA from the solid phase bodies by means of an elution buffer.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismenkulturen mit Hilfe von Festphasenkörpern. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man a) die Mikroorganismenkultur auf einen sauren pH-Wert bringt, mit den Festphasenkörpern mischt, inkubiert und abtrennt, b) die an den Festphasenkörpern immobilisierten Mikroorganismen resuspendiert, lysiert, mit einem neutralisierenden Bindespuffer versetzt, inkubiert, die Festphasenkörper abtrennt und verwirft, c) den Überstand erneut mit Festphasenkörpern versetzt, inkubiert, anschließend abtrennt und die Plasmid-DNA mit einem Elutionspuffer von den Festphasenkörpern eluiert.

***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Canada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismenkulturen mit Hilfe von Festphasenkörpern.

5

In der Molekularbiologie werden Mikroorganismen (z.B. *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* u.a.) seit langem für Klonierungsexperimente verwendet. Hierzu wird extrachromosomal DNA, die sogenannte Plasmid-DNA, als Vehikel für zu klonierende, spezifische DNA-Stücke eingesetzt.

10

Eine alltägliche Aufgabenstellung für den Fachmann besteht darin, die richtige Bakterienpopulation mit dem gesuchten Plasmid-Klon zu finden. Verschiedene chemische Verfahren sind beschrieben, Plasmid-DNA aus Mikroorganismen zu isolieren. Allen diesen Methoden ist gemeinsam, daß zunächst die Mikroorganismen durch Zentrifugation abgetrennt werden, um das Nährmedium zu entfernen. Das Nährmedium muß möglichst quantitativ entfernt werden und der erhaltene Mikroorganismenniederschlag muß vollständig in einem Resuspensionspuffer resuspendiert werden.

15

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismen zur Verfügung zu stellen, das zur Entfernung des Nährmediums keinen Zentrifugationsschritt benötigt.

20

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismenkulturen mit Hilfe von Festphasenkörpern, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man

25

- a) die Mikroorganismenkultur auf einen sauren pH-Wert bringt, mit den Festphasenkörpern mischt, inkubiert und abtrennt,
- b) die an den Festphasenkörpern immobilisierten Mikroorganismen resuspendiert, lysiert, mit einem neutralisierenden Bindepuffer versetzt, inkubiert, die Festphasenkörper abtrennt und verwirft,

30

c) den Überstand erneut mit Festphasenkörpern versetzt, inkubiert, anschließend abtrennt und die Plasmid-DNA mit einem Elutionspuffer von den Festphasenkörpern eluiert.

5      Als Festphasenkörper kommen Kieselgele, Silicate oder glasartige Materialien, vorzugsweise magnetische Festphasenkörper mit Kieselgeleoberfläche in Frage, insbesondere magnetische Silica-Partikel.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß Bakterien unter bestimmten  
10     Pufferbedingungen an magnetisierbare Festphasenkörper mit Kieselgel-  
oberfläche unspezifisch binden und direkt aus dem Nährmedium magnetisch  
abgetrennt werden können. Weiterhin wurde gefunden, daß die so  
eingefangenen Bakterien resuspendiert, lysiert und als kompakter magnetischer  
Niederschlag mitsamt der genomischen DNA ebenso abgetrennt  
15     werden können, wobei die Plasmid DNA im Überstand verbleibt. Die  
Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß sie alle Verfahrensschritte der  
Plasmid-Isolierung automatisierbar macht.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird beispielsweise so durchgeführt, daß  
20     eine Bakterienkultur, die über Nacht in einem Wachstumsmedium inkubiert  
wurde, mit Hilfe von Puffern oder Säuren auf einen sauren pH-Wert eingestellt  
wird. Anschließend werden magnetische Partikel hinzugegeben,  
wenige Minuten inkubiert und die Partikel im magnetischen Feld abgetrennt. Der Überstand wird verworfen und die an den Partikeln anhaftenden  
25     Bakterien in einem Resuspensionspuffer resuspendiert. Danach wird ein  
Lysispuffer zugegeben, gemischt und wenige Minuten bei Raumtemperatur  
inkubiert; ein neutralisierender Bindepuffer (N-Bindepuffer) wird zugegeben,  
gemischt und die Partikel werden im magnetischen Feld abgetrennt.  
Der Überstand wird in ein neues Reagenzgefäß überführt, Partikel zugegeben,  
30     gemischt und im magnetischen Feld abgetrennt. Die Partikel mit der  
gebundenen Plasmid-DNA werden mit Waschpuffer gewaschen und  
schließlich wird die Plasmid-DNA mit Elutionspuffer eluiert.

Bei den Mikroorganismenkulturen handelt es sich vorzugsweise um E. Coli oder E. Coli -Mutanten, wie W3110, JM109, RR1, XL-1 Blue u.a. Diese Kulturen werden in der Regel über Nacht z.B. in einem LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt, 10 g Kochsalz im Liter) bei 37 °C inkubiert.

5

Eine entsprechend hergestellte Kultur wird mit Hilfe von Puffern oder Säuren auf einen pH-Bereich von 1 bis 4, vorzugsweise pH 2, eingestellt. Geeignete Puffer sind solche, die in diesem pH-Bereich eine ausreichende Pufferkapazität besitzen, z.B. Formiat-, Acetat-, Citratpuffer oder auch

10 Säuren wie Salzsäure. 1 ml der Bakterienkultur wird z.B. mit 0,1 ml 1N Salzsäure angesäuert und mit 5-50 µl einer Suspension (50 mg/ml) von magnetischen Silica-Partikeln versetzt, eine Minute inkubiert und im magnetischen Feld abgetrennt. Es hat sich gezeigt, daß in der Regel 5-15 µl der Partikelsuspension ausreichen, um mehr als 50 % der Bakterien abzutrennen. Die Anzahl der hier verwendeten Partikel übersteigt die Anzahl der Bakterien circa um einen Faktor 10-30.

Die an den Partikeln anhaftenden Bakterien werden in einem Resuspensionspuffer resuspendiert. Der Puffer sollte in der Lage sein, einen pH-Wert im Bereich von 7 bis 9 aufrechtzuerhalten; ein geeigneter Resuspensionspuffer besteht z.B. aus Tris-HCl, EDTA und RNase A.

25 Die resuspendierten Bakterien werden mit einem Lysispuffer versetzt, ge-  
mischt und bei Raumtemperatur einige Minuten inkubiert. Der Lysispuffer  
besteht z.B. aus Natronlauge und SDS. Anschließend wird ein neutralisie-  
render Bindepuffer (N-Bindepuffer) zugesetzt, gemischt und die Partikel im  
magnetischen Feld abgetrennt und verworfen. Der N-Bindepuffer sollte  
einen pH-Wert im Bereich von 4 bis 6 aufrechterhalten; ein geeigneter N-  
Bindepuffer besteht z.B. aus einem Guanidiniumsalz und Kaliumacetat.

30 Beide Pufferkomponenten können jedoch auch getrennt und nacheinander  
eingesetzt werden (siehe Beispiel 2).

Der Überstand wird in ein neues Reagenzgefäß überführt, es werden erneut Partikel zugegeben, gemischt und die mit der Plasmid-DNA beladenen Partikel werden im magnetischen Feld abgetrennt und mit Waschpuffer gewaschen. Dieser Puffer sollte im pH-Bereich von 5 bis 7 5 puffern, wobei die DNA an den Partikeln gebunden bleibt. Ein geeigneter Waschpuffer besteht z.B. aus Tris-HCl und EDTA.

Die anschließende Elution der Plasmid-DNA erfolgt mit einem Elutionspuffer. Der dazu verwendete Elutionspuffer sollte einen pH-Bereich von 7,5 10 bis 9,5, vorzugsweise 8 bis 9 aufrechterhalten. Geeignete Puffer sind z.B. Tris-HCl-Puffer, Tricin, Bicin und andere Puffer, die in diesem pH-Bereich puffern, vorzugsweise Tris-HCl. Gegebenenfalls kann der Elutionspuffer Chelatoren wie EDTA und/oder andere Substanzen enthalten. Die Pufferkonzentration sollte 5 bis 10 mM, vorzugsweise etwa 10 mM betragen. 15 Gegebenenfalls kann der Puffer noch geringe Mengen EDTA, z.B. 1 mM, enthalten. Die so eluierte Nucleinsäure ist direkt, ohne weitere Reinigungsschritte, für molekularbiologische Anwendungen, wie z.B. für Ampifikationsreaktionen (PCR, NASBA) einsetzbar.

20 **Beispiel 1**

Materialien

Mikrozentrifugenröhren

Partikelsuspension: 50 mg/ml

Resuspensionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH8,0 / 10 mM EDTA / 5 mg/ml RNase A

25 Lysispuffer: 200 mM NaOH / 1 % SDS

N-Bindepuffer: 5.3 M Gua-HCl / 0.7 M Kaliumacetat, pH 4,8

Waschpuffer: 10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA, pH 6,5

Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA, pH 8,5

Verfahrensschritte

1. Eine Bakterienkultur (1 ml) wird mit 0,1 ml 1N Salzsäure und 10 µl magnetischen Silica-Partikeln gemischt, eine Minute inkubiert und im magnetischen Feld abgetrennt,
- 5 2. der Überstand wird verworfen und die an den Partikeln haftenden Bakterien in 100 µl Resuspensionspuffer resuspendiert,
3. 200 µl Lysispuffer werden hinzugegeben, gemischt und 5 Minuten inkubiert,
4. 400 µl N-Bindepuffer werden hinzugegeben, gemischt und die Partikel abgetrennt,
- 10 5. der Überstand wird in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt,
6. es werden 10 µl Partikelsuspension hinzugegeben, gemischt und die Partikel werden abgetrennt; der Überstand wird verworfen,
7. die Partikel werden zweimal mit Waschpuffer gewaschen und mit
- 15 50 µl Elutionspuffer eluiert.

**Beispiel 2**Materialien

Mikrozentrifugenröhrchen

20 Partikelsuspension: 50 mg/ml

Resuspensionspuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 / 10 mM EDTA / 5 mg/ml RNase A

Lysispuffer: 200 mM NaOH / 1 % SDS

Neutralisierungspuffer: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Bindungspuffer: 5 M Guanidiniumthiocyanat

25 Waschpuffer: 10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA, pH 6,5

Elutionspuffer: 10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA, pH 8,5

Verfahrensschritte

1. Eine Bakterienkultur (1 ml) wird mit 50 µl 1N Salzsäure und 10 µl magnetische Silica-Partikeln gemischt, fünf Minuten inkubiert und im magnetischen Feld abgetrennt,

2. der Überstand wird verworfen und die an den Partikeln haftenden Bakterien in 200 µl Resuspensionspuffer resuspendiert,
3. 200 µl Lysispuffer werden hinzugegeben, gemischt und 5 Minuten inkubiert,
- 5 4. 200 µl Neutralisierungspuffer werden hinzugegeben, gemischt und die Partikel mitsamt dem Niederschlag abgetrennt,
5. der Überstand wird in ein neues Mikrozentrifugenrörchen überführt,
6. es werden das gleiche Volumen Bindepuffer sowie mindestens 10 µl Partikelsuspension hinzugegeben, gemischt und die Partikel werden abgetrennt; der Überstand wird verworfen,
- 10 7. die Partikel werden zweimal gewaschen und die Plasmid DNA mit 50 µl Elutionspuffer eluiert.

15

20

25

30

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Mikroorganismenkulturen mit Hilfe von Festphasenkörpern, dadurch gekennzeichnet, daß man
  - a) die Mikroorganismenkultur auf einen sauren pH-Wert bringt, mit den Festphasenkörpern mischt, inkubiert und abtrennt,
  - b) die an den Festphasenkörpern immobilisierten Mikroorganismen resuspendiert, lysiert, mit einem neutralisierenden Bindepuffer versetzt, inkubiert, die Festphasenkörper abtrennt und verwirft,
  - c) den Überstand erneut mit Festphasenkörpern versetzt, inkubiert, anschließend abtrennt und die Plasmid-DNA mit einem Elutionspuffer von den Festphasenkörpern eluiert.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Mikroorganismen *Escherichia coli* oder *E. Coli*-Mutanten verwendet werden.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Festphasenkörper magnetische Festphasenkörper mit Kieselgeloberfläche verwendet werden.
- 20 4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als magnetische Festphasenkörper Kieselgele, Silicate oder glasartige Materialien verwendet werden.
- 25 5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als magnetische Festphasenkörper Silica-Partikel verwendet werden.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der saure pH-Wert mit Hilfe von Puffern oder Säuren auf einen pH-Wert im Bereich von 1 bis 4 eingestellt wird.
- 5      7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert mit Salzsäure eingestellt wird.

10

15

20

25

30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/08091

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 195 20 398 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 12 December 1996 (1996-12-12) page 4, line 50 - line 59 page 6, line 11 - line 39; claims 1-13; figure 1 ----	1-5
X	US 5 075 430 A (LITTLE MICHAEL C) 24 December 1991 (1991-12-24)	1,2
A	column 1, line 36 - line 65 ----	3-7
A	WO 92 07863 A (DIAGEN INST MOLEKULARBIO) 14 May 1992 (1992-05-14) claims 1-15 ----	1-7
A	US 5 051 189 A (FARRAH SAMUEL R) 24 September 1991 (1991-09-24) table 7 ----	1-7
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 April 2000

Date of mailing of the international search report

07/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Inte ional Application No

PCT/EP 99/08091

**C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 43 07 262 A (BERGEMANN CHRISTIAN) 8 September 1994 (1994-09-08) column 2, line 21 - line 25; claim 8 -----	1-7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

## Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/08091

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19520398	A 12-12-1996	AU 707115	B	01-07-1999
		AU 6300796	A	09-01-1997
		CA 2223821	A	27-12-1996
		CN 1192217	A	02-09-1998
		WO 9641811	A	27-12-1996
		EP 0837871	A	29-04-1998
		JP 11509364	T	17-08-1999
		NO 975772	A	06-02-1998
		NZ 311648	A	30-08-1999
US 5075430	A 24-12-1991	NONE		
WO 9207863	A 14-05-1992	DE 4034036	A	30-04-1992
		DE 59105403	D	08-06-1995
		EP 0555270	A	18-08-1993
		US 5652141	A	29-07-1997
		US 6020186	A	01-02-2000
US 5051189	A 24-09-1991	US 5432077	A	11-07-1995
DE 4307262	A 08-09-1994	NONE		

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08091

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C12N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>1</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 195 20 398 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 12. Dezember 1996 (1996-12-12) Seite 4, Zeile 50 - Zeile 59 Seite 6, Zeile 11 - Zeile 39; Ansprüche 1-13; Abbildung 1 ---	1-5
X	US 5 075 430 A (LITTLE MICHAEL C) 24. Dezember 1991 (1991-12-24) Spalte 1, Zeile 36 - Zeile 65 ---	1,2
A	WO 92 07863 A (DIAGEN INST MOLEKULARBIO) 14. Mai 1992 (1992-05-14) Ansprüche 1-15 ---	3-7
A	US 5 051 189 A (FARRAH SAMUEL R) 24. September 1991 (1991-09-24) Tabelle 7 ---	1-7
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindnerischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

3. April 2000

07/04/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

van Klompenburg, W

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08091

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 43 07 262 A (BERGEMANN CHRISTIAN) 8. September 1994 (1994-09-08) Spalte 2, Zeile 21 - Zeile 25; Anspruch 8	1-7

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08091

im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 19520398 A	12-12-1996	AU	707115 B	01-07-1999
		AU	6300796 A	09-01-1997
		CA	2223821 A	27-12-1996
		CN	1192217 A	02-09-1998
		WO	9641811 A	27-12-1996
		EP	0837871 A	29-04-1998
		JP	11509364 T	17-08-1999
		NO	975772 A	06-02-1998
		NZ	311648 A	30-08-1999
US 5075430 A	24-12-1991	KEINE		
WO 9207863 A	14-05-1992	DE	4034036 A	30-04-1992
		DE	59105403 D	08-06-1995
		EP	0555270 A	18-08-1993
		US	5652141 A	29-07-1997
		US	6020186 A	01-02-2000
US 5051189 A	24-09-1991	US	5432077 A	11-07-1995
DE 4307262 A	08-09-1994	KEINE		